

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif dengan desain penelitian secara observasional, yaitu menggambarkan tentang keamanan obat tradisional mengenai kandungan *Escherichia coli* dan kandungan Siklambat pada jamu kunyit asem yang dijual di beberapa Pasar Tradisional Kota Malang.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada 4 penjual jamu yang berada di sekitar Pasar Besar, Pasar Oro – Oro dowo, Pasar Bareng, dan Pasar Sukun di Kota Malang. Dari setiap penjual jamu diambil 1 jenis sampel yaitu jamu kunyit asem yang kemudian diuji kandungan bakteri *Escherichia Coli* dan pemanis buatan Siklambat di Laboratorium Biologi Media Lingkungan & Biomarker dan Laboratorium Kimia Fisika Padatan, Material & Biomarker di Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Kota Surabaya.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan 17 – 28 Februari 2020.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

A. Identifikasi *Escherichia Coli*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah coolbox, rak tabung reaksi, pipet volume steril, bola hisap, pemanas spirtus, korek api, ose jarum/bulat, inkubator, laminar air flow, mikroskop, objek glasss dan lemari pendingin.

B. Uji Siklambat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, kaca arloji, sendok, batang pengaduk, erlenmeyer, pipet ukur, pipet volume, corong, kertas saring, pipet tetes, botol semprot, penangas air, oven, desikator dan neraca analitik.

3.3.2 Bahan

A. Identifikasi *Escherichia Coli*

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel jamu kunyit asem, aquadest steril, Alkohol, Buffer Fosfat, LTB 1, Brilliant Green Lactose Broth (BGLB), Tryptone water, Reagen Kovacs, Nutrient Agar (NA), Kristal Violet, Larutan Iodin, Safranin dan minyak emersi.

B. Uji Siklamat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel jamu kunyit asem, aquadest, arang aktif, HCl, BaCl₂, dan NaNO₂.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah variabel bebas yaitu keamanan pada jamu kunyit asem.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Keamanan pada jamu kunyit asem	Syarat obat tradisional dari segi mikrobiologi dan segi kimia yang memenuhi standar keamanan mutu obat tradisional dan dapat berkhasiat.	1. Uji MPN	Jumlah <i>Escherichia coli</i> dengan koloni hijau kilap logam harus <3MPN/ml. (BPOM RI, 2014 dan SNI, 2009)	Rasio
		2. Pewarnaan gram	Bakteri gram negatif bentuk batang berwarna merah	Nominal
		3. Metode pengendapan gravimetri	Terdeteksi apabila terdapat endapan setelah dikeringkan dan ditimbang	Rasio

			>1,250 g/L maka dinyatakan tidak aman (BPOM, 2019).	
--	--	--	---	--

3.6 Metode Analisis

A. Identifikasi *Escherechia Coli*

1. Cara pengambilan sampel (BAM FDA Chapter 4, 2002).
 - a. Sampel jamu kunyit asam yang diambil dari 4 penjual jamu di beberapa Pasar Tradisional Kota Malang.
 - b. Pengambilan sampel jamu hanya dilakukan satu kali pengambilan dengan masing-masing penjual diambil 1 botol sampel jamu, sehingga total jumlah sampel jamu yang didapat sebanyak 4 sampel. Sampel jamu kunyit asem dibawa dengan menggunakan coolbox untuk di uji di laboratorium.
 - c. Sampel jamu kunyit asem harus segera diproses, maksimal 6 jam sejak saat pengambilan sampel. Kemudian sampel diberi label masing-masing.
2. Preparasi Sampel (BAM FDA Chapter 4, 2002)
 - a. Menyiapkan buffer phospat 90 ml, 9 tabung LTB 1 (isi @10 ml), dan buffer phospat (isi @9 ml) sebanyak dua tabung dan dilabeli sesuai sampel masing – masing
 - b. Sampel jamu kunyit asem diambil menggunakan pipet ukur steril sebanyak 10 ml dan dimasukkan dalam erlenmeyer steril 100 ml
 - c. Sampel dilarutkan dengan Buffer phospat sebanyak 90 ml (perbandingan 1:9)
 - d. Dikocok hingga homogen, sehingga diperoleh larutan sampel pada tingkat pengenceran 10^{-1}
 - e. Melakukan pengenceran secara bertingkat dengan cara mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya dan dipindahkan

- pada buffer fosfat steril sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi dan divortex sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2}
- f. Melakukan pengenceran secara bertingkat dengan cara mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya dan dipindahkan pada buffer fosfat steril sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi dan divortex sehingga diperoleh pengenceran 10^{-3}
 - g. Sehingga diperoleh pengenceran pada tingkat 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}

3. Pengujian Most Probable Number (MPN)

Metode ini terdiri dari 3 perlakuan yaitu uji penduga (*Presumptive Test*), uji penegas (*Confirmed Test*) (BAM FDA Chapter 4, 2002)

1) Uji Penduga (*Presumptive Test*)

- a. Sampel awal pada pengenceran 10^{-1} dipipet masing-masing sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi berisi tabung durham dan LTB 1
- b. Sampel pada pengenceran 10^{-2} dipipet masing-masing sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi berisi tabung durham dan LTB 1
- c. Sampel pada pengenceran 10^{-3} dipipet masing-masing sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi berisi tabung durham dan LTB 1
- d. Seluruh tabung LTB yang telah berisi sampel diinkubasi pada suhu $35,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 2 x 24 jam
- e. Hasil positif ditandai dengan kekeruhan dan timbulnya gelembung gas pada tabung durham

2) Uji Penegas (*Confirmed Test*)

- a. Dari hasil positif pada media LTB diambil setiap tabung reaksi sebanyak 1 mata ose dan ditanamkan pada media EC Broth sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi yang berisi tabung durham
- b. Diinkubasi selama $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ selama 2 x 24 jam
- c. Mengamati perubahan yang terjadi dengan ditandai adanya kekeruhan atau munculnya gelembung gas pada tabung durham

- d. Dari hasil positif pada media EC Broth diambil satu mata ose dan ditanamkan pada media Tryptone water sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi
 - e. Diinkubasi selama $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ selama 2 x 24 jam
 - f. Tambahkan reagen kovacs sebanyak 2 tetes pada masing-masing tabung tryptone setelah diinkubasi. Hasil positif *Escherichia coli* akan membentuk cincin merah di permukaan tyrpton water
4. Pewarnaan Gram (SNI, 1992)
- a. Dari hasil positif pada media EC Broth diambil satu mata ose dan ditanamkan pada media NA miring diinokulasikan secara zig -zag
 - b. Diinkubasi selama $35,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 2 x 24 jam
 - c. Membersihkan objek glass dengan alkohol sampai bebas lemak dan dipanaskan di atas nyala api spirtus
 - d. Menginokulasikan satu mata ose dari biakan koloni yang tumbuh pada media NA miring
 - e. Ditetesi satu tetes PZ steril
 - f. Mengeringkan di udara lalu difiksasi di atas nyala api spirtus
 - g. Meneteskan Kristal Violet sebanyak 2 – 3 tetes lalu didiamkan selama 1 menit dan membilas dengan air mengalir
 - h. Meneteskan Lugol Iodin sebanyak 2 – 3 tetes lalu didiamkan selama 1 menit dan membilas dengan air mengalir
 - i. Kemudian preparat diberi larutan etanol 96% setetes demi setetes selama 10 detik dan membilas dengan air mengalir
 - j. Meneteskan larutan safranin sebanyak 2 – 3 tetes lalu didiamkan selama 1 menit dan membilas dengan air mengalir
 - k. Mengeringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi belakang ulasan (jangan sampai merusak ulasan) lalu dikeringkan diudara
 - l. Mengamati preparat dengan perbesaran 40x dilanjutkan dengan menggunakan perbesaran 100x menggunakan minyak emersi
 - m. Hasil pewarnaan gram megatif akan berwarna merah dan bakteri gram positif akan berwarna ungu

B. Uji Siklamat

1) Uji Kualitatif (Marlina, 2016)

- a. 25 ml sampel dimasukkan dalam gelas piala
- b. Diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1 : 1
- c. Ditambahkan sepucuk sendok arang aktif untuk menghilangkan warna contoh
- d. Sampel disaring
- e. Ditambahkan 10 ml HCl 10% ke dalam filtrat
- f. Ditambahkan 10 ml BaCl₂ 10% kemudian diaduk
- g. Biarkan selama 30 menit, jika terjadi endapan disaring
- h. Pada filtrat ditambahkan 10 ml NaNO₂ 10%
- i. Tutup gelas kimia dengan kaca arloji dan larutan dipanaskan di atas penangas air selama 2 jam
- j. Apabila timbul endapan putih maka kandungan siklamat pada sampel yang diteliti positif (sampel mengandung siklamat)

2) Uji Kuantitatif (Marlina, 2016)

- a. Bersihkan kaca arloji, panaskan dalam oven dengan suhu 100°C selama 1 jam, dinginkan dalam desikator dan timbang
- b. Sampel dengan hasil positif adanya kandungan siklamat disimpan diruangan tertutup selama semalam dan saring endapan
- c. Pindahkan endapan dengan kertas saring ke kaca arloji yang sudah ditimbang
- d. Keringkan dalam oven dengan suhu 100°C selama 2 jam
- e. Dinginkan dalam desikator
- f. Timbang hingga didapatkan berat konstan

3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

1. Kandungan *Escherichia coli*

Data kandungan *Escherichia coli* pada jamu kunyit asem diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif, yaitu membandingkan antara hasil pengujian dengan standar BPOM.

2. Kandungan Siklamat

Data kandungan Siklamat pada jamu kunyit asem diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif, yaitu membandingkan antara hasil pengujian dengan standar BPOM.